

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07268

研究課題名(和文) 精巣の再生を可能にするシグナルと幹細胞システムの解明

研究課題名(英文) Study of the stem cell and inter cellular signal system underling testicular regeneration in the newt

研究代表者

林 利憲 (Hayashi, Toshinori)

広島大学・両生類研究センター・教授

研究者番号：60580925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イモリ精巣発達や雄性生殖細胞の発生過程に関する基本的な情報と、日長条件が精巣分化に与える影響をまとめた論文を発表した。また、イモリの精巣がTerminal Crestから再生される直接的な証拠を示す結果を移植実験から得た。加えて、イモリの始原生殖細胞が形成される過程において、dazl遺伝子が機能するタイミングを示した。これらの結果については、現在、国際科学雑誌に論文を投稿する準備を進めている。
イベリアトゲイモリのバイオリソースとしての価値を高めるために、全ゲノムシーケンスを開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規のモデル動物であるイベリアトゲイモリにおいて、精巣や雄性生殖細胞の形成過程の詳細が示されたことで、イモリの生殖細胞に対する理解が進んだことに加えて、イベリアトゲイモリのモデル動物としての価値が高まった。
また、本研究から得られた知見は、マウスやゼブラフィッシュ、ツメガエルといったモデル生物と比較する基盤となるため、脊椎動物における生殖細胞分化機構の全体像を明らかにすることにも貢献する。

研究成果の概要(英文)： In this study, we published a paper that provides basic information on newt testis development and the developmental process of male germ cells, as well as the effects of day-length on testis differentiation. In addition, results from transplantation experiments showed clear evidence that newt testes are regenerated from Terminal Crest. These results are currently being prepared for submission to an international scientific journal. In addition, we have identified two steps in the formation of primordial germ cells in which the dazl gene functions. We also conducted whole genome sequencing to enhance the value of Iberian ribbed newt as a bioresource.

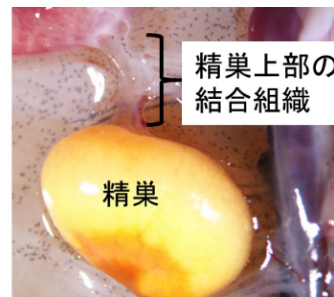
研究分野：再生生物学

キーワード：イベリアトゲイモリ 精巣 再生

1. 研究開始当初の背景

有尾両生類に属するイモリは、既知の脊椎動物の中で最も強い再生能力を持ち、四肢や尾、水晶体や網膜、角膜に加えて、脳や心臓など、体の様々な部位を再生する。このようなイモリは精巣を完全に除去されても、再生できる。

イモリの多様な再生可能部位にあって、精巣の再生は次の3点の特徴を持つ。生殖細胞を含んだ器官の再生である。Terminal Crest と呼ばれる、精巣前方(精巣上部)の結合組織内にある幹細胞が再生に寄与する。精巣に対する損傷とは無関係に、新たに精巣を新生する。特に精巣の再生は、生殖細胞を含む組織が再形成される点で際立っている。この再生を可能とする原理を理解することは、哺乳類が精巣を再生できない原因の解明にもつながる。しかしながら、これらの現象に関する基礎医学的、生物学的に重要な問いのほとんどが未解決である。



[図1]イモリ精巣と周辺組織

イモリ精巣の再形成を制御する機構が未解明である原因は、イモリの遺伝子を操作して、その機能を解析できる実験系が無かったこと、これまで国内外の研究で一般に用いられてきたイモリの種(例えば日本産アカハライモリやアメリカ産プチイモリ)は性成熟に3-5年を要すること、精巣の発達や精子形成に季節性があること等の研究上の制約にある。

また、再生は一度形成された器官が損傷を受けることによって開始された現象であるため、その再生過程を詳細に解析するためには、初めに精巣の形成過程(発生過程)自体を知っておくことが不可欠である。しかしながら、先に述べた理由から、イモリの受精から性成熟までの全期間を実験室内で解析することは困難であった。そのためイモリの精巣がどのような過程を経て形成され、器官として成熟していくのかも不明であった。

このような状況に対して研究代表者らのグループは、以前より、スペイン原産のイベリアトゲイモリ(*Pleurodeles waltl*)を導入して、新規モデル動物として整備する研究を進めてきた。本種は、他の有尾両生類に比較して受精から短期間で性成熟する上に、季節を問わず1年を通じて成熟した精子を得ることができる。そのため、精巣再生実験のモデル動物としても優れるだけでなく、生殖細胞の形成過程や生殖巣の発達から成熟までの全過程を研究することも可能である。このイベリアトゲイモリを用いれば、これまでのイモリでは困難であった精巣再生の機構、あるいは再生を支える幹細胞システムについて、遺伝子レベルの詳細な実験と解析が可能になると考えた。

2. 研究の目的

イモリの精巣再生について詳細な解析をするためには、まず、既存の再生がどのような過程を経て形成されるのかを知る必要がある。そこで本研究では、初めにイベリアトゲイモリを用いて、受精2週間後の孵化間もない幼生から、性成熟までの生殖巣(主に精巣)の全発達過程を示すことを目的とした。

その上で、イモリの精巣切除実験を行い、精巣の再生がどのような過程を経て成立するのかを明らかにすることを目的とした。さらに、イモリの生殖細胞の形成をより深く理解するために、発生過程における生殖細胞の決定機構の解明も目指した。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が新規モデル動物として確立したイベリアトゲイモリ(*Pleurodeles waltl*)を用いて行った。本種は、短期間で性成熟する上、季節に関係なく精子形成する為、生殖細胞の形成、精巣の分化に加えて、精巣再生のモデルとしても利用できる。また、必要な時に大量の受精卵を得ることができることを利用して、高効率な遺伝子導入やゲノム編集ができる実験系を構築している。

(1)イモリ精巣形成過程の解析

イベリアトゲイモリの幼生期から成体における精巣の発達過程を観察した。また、精子分化と日長の関係を明らかにするために、イモリを短日と長日それぞれの条件で飼育した。

(2)イモリ精巣の再生機構の解析

成体のイモリから、分化した精巣を切除して、精巣の再生がどのような時間的な経過を得て、どの組織から再生するのかを解析した。

(3)イモリ生殖細胞の決定機構の解析

受精卵に対するマイクロインジェクションを介した遺伝子操作実験により、イモリにおいて生殖細胞特異的に発現する遺伝子である *dazl* および *vasa* の機能解析を行なった。

4. 研究成果

(1) イモリ精巣形成過程の解析

本研究では、イベリアトゲイモリの受精後2週の幼生期から12ヶ月以上経過した成体まで精巣の発達過程を詳細に調べた。その結果、受精後2ヶ月から生殖巣の形態に雌雄の差が現れ、受精後6ヶ月で雄から受精能のある精子が採取可能となることが分かった(図2および図3)。また、精子形成は、成体を解剖した時期とは無関係に、精巣内で進行していることが示された。さらに、イモリの生育環境条件が生殖細胞の分化に及ぼす影響を調べるため、イモリを飼育する際の照明を長日条件と、短日条件に設定して受精後2ヶ月から性成熟する受精後6ヶ月まで飼育して、両グループの精巣を比較した。その結果、精巣の発達に形態的な違いは確認されず、どちらの条件でも同様に生殖細胞の増殖が観察された。これらの結果から、飼育下のイベリアトゲイモリ精巣の成熟に要する期間は他種イモリと比較して極めて短期間であり、また雄性生殖細胞の分化が日長に影響を受けないことが判明した。加えて、VASA タンパク質がイモリ生殖細胞のマーカータンパク質として使用できることを示した(図4)。これらの成果に関しては、国際科学雑誌にて発表した。

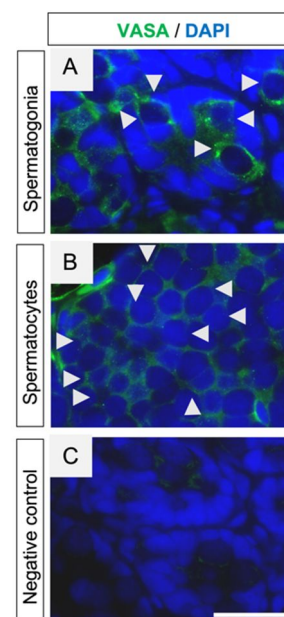
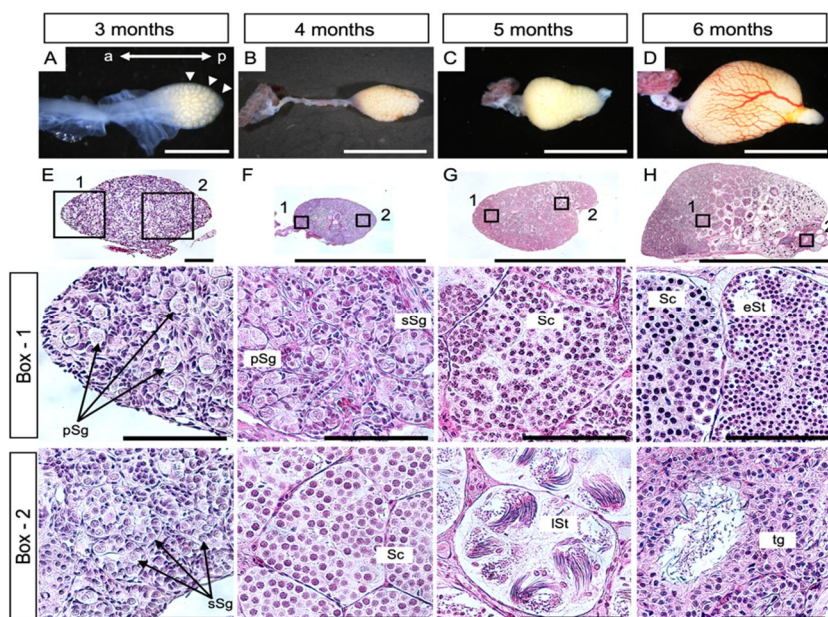
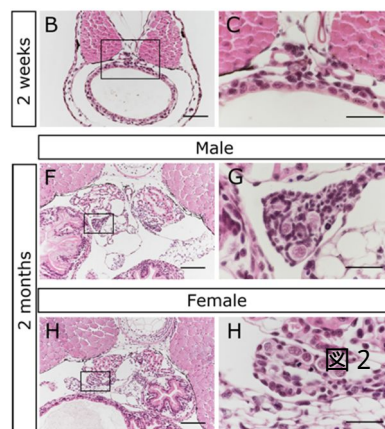


図3

図4

(2) イモリ精巣の再生機構の解析

イモリの精巣再生は、既存の精巣の切除から6ヶ月でほぼ完了することがわかった。再生した精巣には成熟した精巣を特徴づける腺組織や分化した精細胞が存在していた。

また、イモリの精巣は Terminal Crest から再生することを移植実験から明らかにした。Terminal Crest に対する精巣再生の開始スイッチは、分化した精巣の切除から1ヶ月以内に入ることが分かった。

さらに、Terminal Crest 内に存在すると考えられる幹細胞の分化は、雄性ホルモンによって制御されていることが示唆された。

(3) イモリ生殖細胞の分化機構の解析

まず、*dazl* 遺伝子の母性因子としての機能を明らかにするため、受精卵に存在する *dazl* 遺伝子の mRNA からの翻訳を阻害する実験を行った結果、その阻害時期に依存して始原生殖細胞の数に影響が現れることが分かった。次に、接合子由来に発現する *dazl* 遺伝子の機能を解析する目的で *dazl* 遺伝子のノックアウトを行ったところ、母性因子の阻害よりも後の発生段階において、生殖細胞の数が減少することが示された。一方、*vasa* 遺伝子のノックアウト個体においては生殖細胞が形成されたことから、イモリにおいて *vasa* は生殖細胞形成に必須でないことが判明した。

(4) バイオリソースの強化と、国内の研究者への提供

本研究機関の開始と同時に、研究代表者は広島大学両生類研究センターに異動した。両生類研究センターにおいて、イベリアトゲイモリの繁殖コロニーを拡大させることに成功し、本イモリの利用を希望する研究者に実験用イモリ個体を提供する体制を確立することができた。

本研究期間の3年間において、述べ100件以上のイモリ生体の提供を実施した。

(5) イモリゲノムプロジェクト

イベリアトゲイモリを活用した研究を推進していく上では、ゲノム情報の整備が不可欠である。そこで研究代表者が確立した高度近交系の個体を材料に、全ゲノム配列の取得を目指したプロジェクトを開始した。

研究代表者が近交化したイベリアトゲイモリ個体からゲノムDNAを抽出して、ロングリードシーケンサーによる配列取得を実施した結果、イベリアトゲイモリの予想されるゲノムサイズの20倍に相当する配列情報を得ることができた。現在はゲノムアセンブルやトランスクリプトームデータの解析をしており、データベースの構築を進めている。このような新規モデル生物、さらには巨大ゲノムの解読はイモリのユーザーのみならず、様々な分野へのインパクトが期待できる。このゲノム情報が公開されることで、イベリアトゲイモリを新規モデルとして利用するユーザーの増加が見込まれると同時に、研究情報の整備がもたらす研究の質の向上が期待される。

なおイベリアトゲイモリのゲノムプロジェクトについては、基礎生物学研究所の新規モデル生物開発共同利用研究の支援を受け(2019年度~2021年度)、研究代表者を含むイベリアトゲイモリ研究コンソーシアムのメンバー(<https://www.nibb.ac.jp/imori/main/>)が中心となり行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yun Maximina H., Hayashi Toshinori, Simon Andras	4. 巻 251
2. 論文標題 Standardized gene and genetic nomenclature for the newt, <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 911-912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.355	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 林利憲	4. 巻 99
2. 論文標題 ゲノム編集技術が創り出す新しいモデル両生類、イベリアトゲイモリ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 261-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Toshinori, Nakajima Mie, Kyakuno Mitsuki, Doi Kanako, Manabe Ikumi, Azuma Shouhei, Takeuchi Takashi	4. 巻 63
2. 論文標題 Advanced microinjection protocol for gene manipulation using the model newt <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The International Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180297th	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 2. Abe G, Hayashi T, Yoshida K, Yoshida T, Kudoh H, Sakamoto J, Konishi A, Kamei Y, Takeuchi T, Tamura K, Yokoyama H	4. 巻 100
2. 論文標題 Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Semin Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 109-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcd.2019.11.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyakuno Mitsuki, Nakamori Rei, Tazawa Ichiro, Uemasu Hitoshi, Namba Noriyuki, Tsunekawa Naoki, Noce Toshiaki, Satoh Yukio, Takeuchi Takashi, Hayashi Toshinori	4. 巻 63
2. 論文標題 Photoperiod independent testicular development in the model newt, <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 277 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uemasu Hitoshi, Ikuta Hiromi, Igawa Takeshi, Suzuki Makoto, Kyakuno Mitsuki, Iwata Yui, Tazawa Ichiro, Ogino Hajime, Satoh Yukio, Takeuchi Takashi, Namba Noriyuki, Hayashi Toshinori	4. 巻 251
2. 論文標題 Cryo injury procedure induced cardiac regeneration shows unique gene expression profiles in the newt, <i>Pleurodeles waltl</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 864 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Kaoru, Taguchi Yuki, Kobayashi Ryomei, Anzai Wataru, Hayashi Toshinori, Tokita Masayoshi	4. 巻 195
2. 論文標題 Cranial skeletogenesis of one of the largest amphibians, <i>Andrias japonicus</i> , provides insight into ontogenetic adaptations for feeding in salamanders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Journal of the Linnean Society	6. 最初と最後の頁 299 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/zoolinnean/zlab038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Takashi, Matsubara Haruka, Minamitani Fumina, Satoh Yukio, Tozawa Sayo, Moriyama Tomoki, Maruyama Kohei, Suzuki Ken-ichi T., Shigenobu Shuji, Inoue Takeshi, Tamura Koji, Agata Kiyokazu, Hayashi Toshinori	4. 巻 149
2. 論文標題 Newt <i>Hoxa13</i> has an essential and predominant role in digit formation during development and regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.200282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Akira, Kashimoto Rena, Ohashi Ayaka, Furukawa Saya, Yamamoto Sakiya, Inoue Takeshi, Hayashi Toshinori, Agata Kiyokazu	4. 巻 8
2. 論文標題 An approach for elucidating dermal fibroblast dedifferentiation in amphibian limb regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-022-00190-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hayashi T, Uemasu H, Ikuta H, Igawa T, Kyakuno M, Tazawa I, Ogino H, Takeuchi T, Namba N
2. 発表標題 Introduction of Iberian Ribbed Newt as the Emerging Amphibian Model for Cardiac Regeneration
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林利憲、中島 美英、梅山 穂香、岡村 珠代、佐久間 哲史、山本 卓、竹内 隆
2. 発表標題 p53遺伝子に着目したイモリのがん抵抗性の研究
3. 学会等名 第27回がん予防学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 客野瑞月、佐久間哲史、鈴木賢一、山本卓、野瀬俊明、恒川直樹、竹内隆、林利憲
2. 発表標題 新規モデル生物“イベリアトゲイモリ”を用いた始原生殖細胞決定の分子機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 客野瑞月、佐久間哲史、鈴木賢一、山本卓、田澤一朗、古野伸明、野瀬俊明、恒川直樹、竹内隆、林利憲
2. 発表標題 dazl遺伝子はイモリの性分化以前の生殖細胞形成に機能する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤史哉，鈴木大輔，林利憲、松本健郎、前田英次郎
2. 発表標題 腱損傷再生モデル確立を目指したイペリアトゲイモリ屈筋腱の力学特性の計測
3. 学会等名 TOKAI ENGINEERING COMPLEX 2021(TEC21)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi T, Kyakuno M, Ikuta H, Manabe I, Takeuchi T
2. 発表標題 Study of the stem cell system from organ regeneration in the newt.
3. 学会等名 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林利憲
2. 発表標題 イペリアトゲイモリユーザーのためのコミュニティリソース
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林利憲
2. 発表標題 イモリが見せる多様な再生様式
3. 学会等名 第2回再生学異分野融合研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林利憲
2. 発表標題 新しいモデル動物、イペリアトゲイモリとイペリアリサーチコンソーシアム
3. 学会等名 第28回琉球実験動物研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 客野瑞月、佐久間哲史、鈴木賢一、山本卓、野瀬俊明、恒川直樹、竹内隆、林利憲
2. 発表標題 有尾両生類の始原生殖細胞決定におけるvasaおよびdazlの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会福岡大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林利憲、土井香奈子、平良和夏子、竹内隆
2. 発表標題 新規モデル両生類イペリアトゲイモリの精子凍結保存法の開発
3. 学会等名 CRYO PRESERVATION CONFERENCE
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 客野瑞月、佐久間哲史、鈴木賢一、山本卓、野瀬俊明、恒川直樹、竹内隆、林利憲
2. 発表標題 有尾両生類の始原生殖細胞の決定におけるvasaおよびdazl遺伝子機能の解析
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田裕美、東翔平、竹内隆、林利憲
2. 発表標題 イモリ心臓再生過程におけるcyclin D1の発現制御機構の研究
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松波雅俊、鈴木美有紀、原本悦和、福井雅彰、井上武、山口勝司、内山郁夫、森一樹、田代康介、伊藤弓弦、竹内隆、鈴木賢一、阿形清和、重信秀治、林利憲
2. 発表標題 発生・再生生物学の新規モデル生物イベリアトゲイモリの網羅的遺伝子発現解析とデータベース整備
3. 学会等名 第90回日本動物学会大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川薫、田口勇輝、林利憲、土岐田昌和
2. 発表標題 有尾類における頭骨形成パターンの種間比較
3. 学会等名 第58回爬虫両生類学会岡山大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹原舞, 客野瑞月, 佐藤幸雄, 竹内隆, 田澤一朗, 古野伸明, 林利憲
2. 発表標題 イモリにおける精巢再生機構の解明
3. 学会等名 第92回 日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸角 涼介, 客野 瑞月, 上榎 仁志, 難波 範行, 田澤 一朗, 古野 伸明, 林 利憲
2. 発表標題 イモリの膀胱の発達過程の解析
3. 学会等名 イモリの膀胱の発達過程の解析イモリの発生初期における生殖細胞形成には母性因子が寄与する
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 客野瑞月, 佐久間哲志, 鈴木賢一, 山本卓, 田澤一朗, 古野伸明, 野瀬俊明, 恒川直樹, 竹内隆, 林利憲
2. 発表標題 イモリの発生初期における生殖細胞形成には母性因子が寄与する
3. 学会等名 イモリの発生初期における生殖細胞形成には母性因子が寄与する
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kyakuno M, Sakuma T, Suzuki K, Yamamoto T, Tazawa I, Furuno N, Noce T, Tsunekawa N, Takeuchi T, Hayashi T
2. 発表標題 Maternal expression of <i>dazl</i> contributes to the early stage of PGC differentiation in the urodele amphibian
3. 学会等名 54th Annual Meeting of JSDB (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木賢一, 鈴木美有紀, 林 利憲	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 16
3. 書名 ゲノム編集実験スタンダード (Crispant:両生類における遺伝子機能解析)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------